

# 1 Einleitung

Scrapie gehört zu den transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE), die auch als Prionkrankheiten bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um infektiöse, in der Regel tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen von Menschen und Tieren.

Auslöser dieser Erkrankungen ist eine pathologisch veränderte Form eines körpereigenen Proteins, das fehlgefaltete proteinaseresistente Prionprotein. Der Begriff "**Prion**" wurde geprägt von Stanley B. Prusiner, dem 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichneten Pionier der Prionforschung. Er leitet sich ab von den Begriffen proteinaceous infectious particle (proteinöses infektiöses Partikel). Prusiner formulierte mit der **protein-only-Hypothese** auch ein neues infektionsbiologisches Prinzip, demzufolge bei TSE nur ein Protein, das fehlgefaltete Prionprotein, das infektiöse Agens darstellt (Prusiner, 1982). Abgekürzt wird diese abnorme Form als **PrP<sup>Sc</sup>**, weil sie zum ersten Mal aus dem Gehirn eines Scrapie-infizierten Schafs isoliert worden war.

## 1.1 Überblick über die TSE

### 1.1.1 TSE des Menschen

Die **Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)** wurde im Jahre 1920 bzw. 1921 von den deutschen Ärzten Hans-Gerhard Creutzfeldt und Hans Jakob beschrieben (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). Die häufigste Form der CJD ist die **sporadische CJD (sCJD)**. Diese Form tritt spontan auf, ist also weder durch eine Mutation des Priongens entstanden, noch wurde sie durch eine Infektion mit einem pathogenen Prionprotein erworben (Will, 1993). Die sCJD stellt 85 % aller CJD-Fälle und tritt weltweit mit einer Inzidenz von etwa einem Fall pro 1 Million Einwohner pro Jahr auf. Das Durchschnittsalter der sCJD-Patienten liegt bei 55 - 60 Jahren. Zu den sporadischen TSE beim Menschen gehört auch die seltene, erst 1999 entdeckte **sporadische familiäre Insomnie (SFI)** (Parchi et al., 1999).

Die Gruppe der familiären TSE ist durch das Auftreten einer autosomal dominant vererbten Punktmutation des Gens für das Prionprotein gekennzeichnet. Zu diesen gehört die **familiäre CJD (fCJD)**, das 1936 erstmals beschriebene **Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)** (Gerstmann et al., 1936) sowie die **fatale familiäre Insomnie (FFI)** (Manetto et al., 1992). Diese Erkrankungen unterscheiden sich untereinander in Abhängigkeit von der speziellen Mutation des Priongens hinsichtlich der klinischen Symptomatik und der pathologischen Befunde.

Die **iatrogene CJD (iCJD)** wird durch ärztliche Eingriffe, z.B. durch die Gewebetrans-

plantation von Cornea oder Dura mater CJD-kranker Patienten oder bei neurochirurgischen Eingriffen mit kontaminierten und unzureichend sterilisierten Instrumenten übertragen. Weiterhin ist die iCJD auch bei der Behandlung mit Wachstumshormonen übertragen worden, die aus CJD-kontaminierten Hypophysenpools gewonnen wurden (Fradkin et al., 1991).

**Kuru** ist eine endemische Form einer durch Infektion übertragenen TSE. Betroffen sind Angehörige des Fore-Stammes auf Papua-Neuguinea, die Infektion erfolgte durch rituellen Kannibalismus (Gajdusek, 1977). Nach Erkennen des Übertragungsweges und entsprechender Prävention ist die Kuru heute praktisch erloschen.

In den Fokus des öffentlichen Interesses gerückt wurden die TSE schließlich im Jahr 1996 durch die Entdeckung der **neuen Variante der CJD (vCJD)** (Will et al., 1996). Von den anderen bekannten Formen der CJD unterscheidet sich die vCJD durch den frühen Beginn (das Durchschnittsalter der vCJD-Patienten liegt bei 30 Jahren), einen längeren klinischen Verlauf (durchschnittlich 2 Jahre gegenüber 6 Monaten bei sCJD), die Abwesenheit der CJD-typischen Veränderungen im Elektroenzephalogramm und neuropathologisch durch das Auftreten charakteristischer "florider Amyloidplaques" (Ironsides, 2002).

Die vCJD gilt als die menschliche Form der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) (Hill et al., 1997). Hierfür gibt es eine Reihe deutlicher Hinweise, beispielsweise ein übereinstimmendes PrP<sup>Sc</sup>-Glykosylierungsmuster (siehe Punkt 1.2.1) von vCJD und BSE oder die Beobachtung, dass die Infektion von Makaken mit dem BSE-Erreger dieselben neuropathologischen Veränderungen auslöst, wie sie auch bei der vCJD beobachtet werden (Laszmézas et al., 1996).

### 1.1.2 TSE der Säugetiere

Die älteste bekannte TSE ist **Scrapie** bei Schafen und Ziegen, die im Jahr 1755 erstmals erwähnt und 1759 von dem Veterinärmediziner J. G. Leopoldt als "Traberkrankheit" beschrieben wurde (Brown & Bradley, 1998). Namensgebend für die Bezeichnung "Traberkrankheit" und für die heute allgemein gebrauchte Bezeichnung "Scrapie" waren jeweils klinische Symptome, nämlich charakteristische Bewegungsstörungen bzw. ein starker Juckreiz (englisch: to scrape = kratzen) der erkrankten Tiere, der zu Wollverlust und damit zu wirtschaftlicher Bedeutung der Krankheit führte. Anhand der erfolgreichen experimentellen Infektion von Schafen mit dem Scrapieerreger wurde 1936 zum ersten Mal die Übertragbarkeit einer TSE festgestellt (Cuillé & Chelle, 1936). Scrapie tritt heute weltweit auf mit Ausnahme von Australien und Neuseeland. Als natürlicher Übertra-

gungsweg wird ein horizontaler wie vertikaler Modus angenommen (Hoinville, 1996). Scrapie tritt heute weltweit auf mit Ausnahme von Australien und Neuseeland, wo sie durch rigorose Schlachtungsprogramme getilgt wurde.

Die **bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)** wurde erstmals im Jahr 1985 in Großbritannien diagnostiziert. Möglicherweise ist diese Krankheit durch einen an das Rind adaptierten Scrapieerreger entstanden. Im Jahr 1987 stellten Wells und Kollegen fest, dass BSE durch Tierkörpermehl übertragen werden kann (Wells et al., 1987). Dieses war als preiswerte Proteinquelle dem Kraftfutter beigemischt und seit 1981 bei der Herstellung aus Kostengründen weniger stark erhitzt worden, wodurch eine vollständige Inaktivierung des Erregers nicht mehr gewährleistet war. Durch den Export kontaminierten Tierkörpermeihls aus Großbritannien wurde die BSE in andere europäische Länder verbreitet. Im Zeitraum von 1987 bis Ende 2004 sind weltweit inzwischen annähernd 190000 BSE-Fälle festgestellt worden, wovon 184045 auf Großbritannien und 5126 auf die restliche Welt entfallen (Stand: Ende 2004; Quelle: World Organisation for Animal Health (OIE) [www.oie.int](http://www.oie.int)). Um die Ausbreitung der BSE zu verhindern, ist seit 2001 in der gesamten europäischen Union die Verfütterung von Tierkörpermehl an alle Nutztiere verboten.

In Deutschland wurde am 26.11.2000 der erste Fall von BSE bei einem Rind einheimischen Ursprungs festgestellt; seitdem sind 382 weitere Fälle bestätigt worden (Stand: 22.08.2005, Quelle: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft [www.verbraucherministerium.de](http://www.verbraucherministerium.de)). Bezüglich des Infektionsweges hält man inzwischen neben der Übertragung durch Kraftfutter auch eine Infektion durch Milchaustauschfutter bei der Aufzucht von Kälbern für möglich, weil darin bis in das Jahr 2001 auch in Tierkörperverwertungsanstalten gewonnene tierische Eiweiße und Fette enthalten sein durften. Eine horizontale Übertragung ist zwar möglich, scheint aber nur wenig relevant zu sein, da fast immer nur Einzeltiere erkranken. Zusätzlich zur infektiös übertragenen BSE ist auch eine weitere, möglicherweise sporadische Form der BSE entdeckt worden, die sich hinsichtlich des Ablagerungsmusters von der bisher bekannten unterscheidet und der sCJD ähnelt (Casalone, 2003).

Die **übertragbare Enzephalopathie der Nerze (transmissible mink encephalopathy (TME))** ist eine Prionerkrankung, die bei in Gefangenschaft gehaltenen Nerzen auftritt. Ausgelöst wird sie durch Fütterung mit tierischen Produkten, die mit dem Scrapie- oder BSE-Erreger kontaminiert sind (Marsh et al., 1991). Eine weitere Prionerkrankung der Tiere ist die **feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)**, die bei Hauskatzen und in Zoologischen Gärten gehaltenen exotischen Wildkatzen durch Fütterung von mit dem

BSE-Erreger kontaminierten tierischen Produkten ausgelöst wird (Kirkwood & Cunningham, 1994; Ryder et al., 2001).

Der gleiche Infektionsweg wird auch für die **spongiforme Encephalopathie bei Zooungulaten**, (Wells & McGill 1992) und für die **chronische Verfallskrankheit (chronic wasting disease (CWD))** angenommen. Letztere tritt bei verschiedenen, in Gehegen gehaltenen Hirscharten und Elchen in Nordamerika, Kanada und Südkorea auf; als einzige TSE ist sie aber auch bei wildlebenden Tieren festgestellt worden. Für die CWD wird deshalb auch eine horizontale und vertikale Übertragung angenommen (Williams & Miller, 2002).

## 1.2 Eigenschaften des Erregers

Das zelluläre Prionprotein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein von 254 (Maus und Hamster) bzw. 253 (Mensch) Aminosäuren Länge, das auf fast allen Zelltypen, besonders stark aber auf Neuronen, exprimiert wird.  $\text{PrP}^{\text{C}}$  wird im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Vom primären Translationsprodukt werden die N-terminalen Aminosäuren 1-22 als Signalpeptid abgespalten (Harris et al., 1993). Weiterhin entsteht eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 179 und 214, und außerdem erfolgen Glykosylierungen:  $\text{PrP}^{\text{C}}$  besitzt zwei Asparagin-Glykosylierungsstellen an Position 181 und 197 und liegt nach Isolierung stets als ein Gemisch aus unglykosylierter, monoglykosylierter und diglykosylierter Form vor (Riesner, 2003). Schließlich umfassen die posttranslationalen Modifikationen noch den Ersatz der C-terminalen Aminosäuren 232-253 durch einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker, durch den  $\text{PrP}^{\text{C}}$  auf der Zelloberfläche verankert wird (Stahl et al., 1987). Dorthin gelangt  $\text{PrP}^{\text{C}}$  über den Golgi-Apparat und ist dann in der Zellmembran in cholesterinreichen Mikrodomänen, sog. caveolae-like domains, lokalisiert (Vey et al., 1996). Die Funktion des  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ist noch nicht endgültig geklärt, offensichtlich besitzt es aber keine vitale Funktion, da Mäuse, denen das PrP-Gen fehlt, keine Entwicklungsstörungen und außer einem veränderten Circadianrhythmus keine Verhaltensänderungen zeigen (Tobler et al., 1996; Büeler et al., 1992). Diskutiert wird eine antitoxische und antioxidative Rolle, da  $\text{PrP}^{\text{C}}$  am N-Terminus über eine hochkonservierte Oktapeptid-Repeatsequenz verfügt, die Kupfer binden kann und dadurch den Kupferspiegel in den Synapsen regulieren oder eine Superoxid-Dismutase-Funktion wahrnehmen könnte (Kretzschmar et al., 2000; Brown et al., 1999).

$\text{PrP}^{\text{Sc}}$  weist die gleiche Aminosäuresequenz wie  $\text{PrP}^{\text{C}}$  auf, unterscheidet sich jedoch in der Sekundärstruktur darin, dass  $\beta$ -Faltblattstrukturen mit 45 % überwiegen, während

PrP<sup>C</sup> mehrheitlich  $\alpha$ -helikale (40 %) und wenig  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweist (Pan et al., 1993). Durch diese Konformationsänderung ist PrP<sup>Sc</sup> im Gegensatz zu PrP<sup>C</sup> wasserunlöslich und extrem widerstandsfähig gegenüber proteolytischem Abbau, Hitze und herkömmlichen Desinfektionsmitteln.

Wie erfolgt nun die Replikation von PrP<sup>Sc</sup>? Im von Prusiners Arbeitsgruppe vorgeschlagenen "Heterodimer-Modell" bewirkt jeweils ein PrP<sup>Sc</sup>-Monomer durch Anlagerung an ein PrP<sup>C</sup>-Molekül dessen Umfaltung in die PrP<sup>Sc</sup>-Konformation. Nach Dissoziation des so entstandenen Homodimers stehen dann zwei PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle für die weitere Verbreitung zur Verfügung (Raeber et al., 1992). Möglicherweise "hilft" bei der Umfaltung von PrP<sup>C</sup> ein weiteres, noch nicht genau bestimmtes Protein ("Protein X") (Kaneko et al., 1997).

Ein anderes Replikationsmodell (soiled seed-Modell) sieht dagegen in aggregiertem PrP<sup>Sc</sup> einen initialen Kristallisationskern, um den herum sich weitere PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle anlagern. PrP<sup>Sc</sup> ist diesem Modell zufolge als Monomer nicht stabil, sondern wird durch Anlagerung an bestehende Komplexe stabilisiert. Ab einer gewissen Größe zerfallen diese Komplexe und die Zerfallstücke dienen als neue Kristallisationskerne (Jarret & Lansbury, 1993).

Generell ist das Prion-Konzept, demzufolge biologische Information ohne die Beteiligung von Nukleinsäure übertragen wird, lange Zeit sehr umstritten gewesen (Chesebro, 1998; Narang, 2002). Einen deutlichen Hinweis für die Richtigkeit der protein only-Hypothese liefert der Befund, dass Mäuse, denen das Gen für PrP<sup>C</sup> fehlt, PrP<sup>Sc</sup> nicht replizieren können und selbst bei intrazerebraler Injektion von PrP<sup>Sc</sup> nicht erkranken. Transplantiert man in die Gehirne dieser Mäuse Gehirnmaterial, das PrP<sup>C</sup> enthält, und infiziert es anschließend mit PrP<sup>Sc</sup>, so breitet sich die Infektion ausschließlich innerhalb der Grenzen des Transplantats aus (Büeler et al., 1992). Als endgültiger Beweis für die Prionhypothese wird im Allgemeinen die synthetische Herstellung von infektiösem Prionprotein, das auch in vivo infektiös ist, angesehen. Während dies bislang nur im Hefemodell gelungen war (Sparrer et al., 2000; King & Diaz-Avalos, 2004) konnte kürzlich erstmals auch im Tierexperiment durch in vitro erzeugtes PrP<sup>Sc</sup> in Mäusen eine Prionerkrankung ausgelöst werden, wobei diese Mäuse allerdings genetisch so verändert waren, dass sie PrP<sup>C</sup> überproduzieren (Legname et al., 2004).

### **1.3 Pathogenese von TSE**

#### **1.3.1 Pathogenese in der Peripherie und Neuroinvasion**

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist das Zielgebiet der TSE-Erreger, und die intrazere-

brale Infektion mit PrP<sup>Sc</sup> stellt die weitaus effektivste Methode der experimentellen Übertragung dar. Epidemiologisch relevant ist jedoch die orale Übertragung, denn sie wird als Hauptübertragungsweg der BSE auf den Menschen, sowie von Scrapie und BSE auf eine Reihe anderer Spezies (siehe Punkt 1.1.2) angesehen. Beteiligt an diesem Weg sind das lymphoretikuläre System (LRS) sowie das enterische und periphere Nervensystem. Als erster Schritt der peripheren Pathogenese gelangt PrP<sup>Sc</sup> mittels transepithelialen Transports durch M-Zellen aus dem Darmlumen in die Peyerschen Plaques. Diese gehören ebenso wie die Lymphknoten, Tonsillen und Milz zum LRS, dem Ort der peripheren Replikation und Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup>. Innerhalb des LRS repliziert sich das aufgenommene PrP<sup>Sc</sup> vor allem in der Milz und dort in den follikulären dendritischen Zellen (follicular dendritic cells (FDCs)) (Kitamoto et al., 1991). FDCs sind Bindegewebszellen, die mit ihren Fortsätzen in Lymphfollikeln die Keimzentren für die klonale Expansion antigenaktivierter B-Zellen bilden. Fehlen reife FDCs, ist sowohl die PrP<sup>Sc</sup>-Replikation in der Milz als auch die Neuroinvasion signifikant beeinträchtigt (Mabbot et al., 2000; Montrasio et al., 2000). B-Lymphozyten selbst spielen hingegen keine direkte Rolle bei der Replikation und Propagation von PrP<sup>Sc</sup> (Klein et al., 1998) sind aber dadurch in die periphere Pathogenese involviert, dass sie Signale zur Ausreifung und Aufrechterhaltung der FDCs liefern, nämlich Lymphotoxin  $\alpha_1/\beta_1$  und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Montrasio et al., 2000).

Lymphatische Organe sind hauptsächlich sympathisch innerviert und die Fortsätze der FDCs stehen in engem Kontakt zu sympathischen Nervenfasern. Zudem stehen die Ganglien des enterischen Nervensystems über afferente und efferente Fasern mit dem Nervus (N.) splanchnicus und N. vagus in Verbindung. Über den N. splanchnicus gelangt der Erreger ins Rückenmark und kann sich hier zentrifugal und zentripetal ausbreiten. Direkt ins ZNS gelangt die Infektion über den N. vagus, erste Zielorte sind hier der dorsale Motornukleus des N. vagus und der Nucleus solitarius (McBride et al., 2001).

### 1.3.2 Pathogenese im zentralen Nervensystem (ZNS)

Das histopathologische Krankheitsbild der TSE im ZNS ist charakterisiert durch eine diffuse bis plaqueartige, amyloide Ablagerung von PrP<sup>Sc</sup>, durch das Auftreten einer Vakuolisierung von Neuronen und Neuropil sowie durch eine Aktivierung und Proliferation von Mikroglia und Astrozyten, was einer lokal induzierten, chronischen, nicht immunvermittelten Neuroinflammation entspricht (Rezaie & Lantos, 2001).

T-Zell-Infiltrationen konnten nur in wenigen Fällen in den Gehirnen scrapie-infizierter Mäuse nachgewiesen werden (Betmouni et al., 1996; Lewicki et al., 2003), scheinen

jedoch ohne funktionale Bedeutung zu sein, da Mäuse, die weder T- noch B-Lymphozyten besitzen (sog. SCID-Mäuse (severe combined immunodeficient)) nach intrazerebraler Infektion mit PrP<sup>Sc</sup> keine Unterschiede hinsichtlich der neuropathologischen Veränderungen und Überlebenszeiten zeigten (Fraser et al., 1996)

PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen können in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden. PrP<sup>Sc</sup> breitet sich innerhalb der neuroanatomischen Strukturen möglicherweise über neuronale Fortsätze aus (Andreolotti et al., 2002). Das Ausmaß und die Lokalisation der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerung erfolgt nach einem für jeden TSE-Stamm charakteristischen Muster. Als Reaktion auf die PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation werden Mikroglia, die spezialisierten Zellen des ZNS für die Auseinandersetzung mit externen Noxen, aktiviert. Über welche Rezeptoren die Aktivierung von Mikroglia in diesem Zusammenhang erfolgt, ist noch weitgehend ungeklärt (siehe auch Punkt 2.4). Sie ist ein frühes Ereignis in der Pathogenese der TSE, das noch vor dem Einsetzen von Vakuolisierung, Neuronenverlust und klinischen Symptomen beobachtet werden kann (Brown et al., 1996; Giese, 1998). In vitro antworten Mikroglia auf die Zugabe von rekombinanten PrP-Peptid<sup>(106-126)</sup> mit der Produktion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Peyrin et al., 1999). Weiterhin sezernieren aktivierte Mikroglia auch Chemokine, reaktive Sauerstoffspezies und andere Neurotoxine (Hafiz, 2000). Die Mikrogliose kann aber auch nützliche Funktionen haben: Zum einen können Mikroglia PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen phagozytieren (Peyrin et al., 1999), zum anderen können sie Neuronen durch die Sekretion neurotropher Faktoren schützen (Nakajima & Kohsaka, 2004).

Als Folge der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerung werden auch Astrozyten, die Stütz- und Schutzzellen des ZNS, aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt durch proinflammatorischen Zytokine und andere lösliche Faktoren, die von aktivierten Mikroglia sezerniert werden (Hafiz & Brown, 2000; Schultz et al., 2004), aber auch durch eine direkte Interaktion mit PrP<sup>Sc</sup> über noch nicht genau bestimmte Scavenger-Rezeptoren (Wyss-Coray et al., 2003). Aktivierte Astrozyten steigern ebenfalls ihre Zytokin- und Chemokinproduktion, wodurch sie ihrerseits Mikroglia aktivieren und zur Einwanderung in entzündete Hirngebiete bewegen können (Marella & Chabry, 2004).

Zytokine und Chemokine, die von aktivierten Mikroglia, Astrozyten und Neuronen sezerniert werden, spielen also in der Pathogenese der TSE ebenso wie in anderen neurodegenerativen Erkrankungen für die Entwicklung der Neuroinflammation eine wichtige Rolle (Williams et al., 1997).

Der Nervenzelltod in TSE erfolgt sowohl apoptotisch als auch durch Nekrose (Giese et al., 1995). Vieles spricht für eine multifaktorielle Genese: Als Folge der oben erwähnten

Neuroinflammation kommt es zur Sekretion von Zytokinen und neurotoxischen Faktoren durch Mikroglia. Proliferierende Astrozyten sind weniger effektiv in der Regulierung extrazellulärer Glutamatspiegel. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn und glutaminerge Überstimulation führt zu Neuronenschädigung (Exzitotoxizität) (Brown et al., 1999). Zudem verlieren die Neuronen durch die Dezimierung von PrP<sup>C</sup> im Zuge der fortschreitenden PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation an neuroprotektiver Kapazität. Zwar zeigen Mäuse, denen das PrP-Gen fehlt (PrP<sup>0/0</sup>-Mäuse), keinen auffälligen Phänotyp (Büeler et al., 1992), unter pathologischen Bedingungen könnte eine PrP<sup>C</sup>-Defizienz jedoch zum Tragen kommen. In vitro erweisen sich Neuronen aus PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen als hypersensitiv für oxidativen Stress (Brown et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in TSE die Empfindlichkeit PrP<sup>Sc</sup>-infizierter Neuronen gegenüber oxidativem Stress zunimmt (Milhavet & Lehmann, 2002). Schließlich zeigen verschiedene in vitro-Studien, dass aufgereinigtes PrP<sup>Sc</sup> und aus PrP<sup>Sc</sup> gewonnene Peptide direkt neurotoxisch sind (Forloni et al., 1993, Chiesa & Harris, 2001, Brown et al., 1996). Als besonders empfindlich gegenüber der mit der PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation und Gliaaktivierung verbundenen Neurotoxizität zeigt sich eine Unterpopulation GABAerger inhibitorischer Neuronen, die parvalbumin-immunreaktiven Neuronen (Guentchev et al., 1998). Die Vakuolisierung des Hirngewebes kann sowohl Neuronen als auch die Nervenzellen umgebene Neuropil betreffen und besteht in diffusen oder fokal gehäuften, kleinen, runden Vakuolen, die zu Mikrozysten konfluieren können, und für das spongiforme (schwammartige) Erscheinungsbild des Gehirns bei TSE verantwortlich sind. Die Verteilung und das Ausmaß dieser Vakuolen ergeben das stammspezifische, zum Teil auch wirtsabhängige Läsionsprofil der verschiedenen TSE-Erreger (Wells, 1993).

#### **1.4 TSE und die Alzheimer Krankheit**

Wie die TSE gehört auch die Alzheimer Krankheit (Alzheimer's disease (AD)) zu den neurodegenerativen Amyloidosen, d.h. auch sie wird durch die Akkumulation einer unlöslichen, pathogenen Form eines körpereigenen Proteins hervorgerufen. Im Falle der AD ist diese pathogene Form das  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ), das durch enzymatische Spaltung aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein (APP)) entsteht. APP ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein, dessen Funktion noch nicht endgültig geklärt ist. APP kann durch drei Enzyme aufgeschlossen werden. Die  $\alpha$ -Sekretase spaltet ein wasserlösliches Protein ab, während die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase für die amyloidogene Abspaltung von  $A\beta$  verantwortlich sind. Die Ablagerung von  $A\beta$  führt bei der AD ebenso wie in TSE zu Mikroglia- und Astrozytenaktivierung, zu Neuroinflammation und fortschreitender

Neurodegeneration (Eikelenboom et al., 2002). Einen wichtigen Hinweis auf Parallelen zwischen TSE und AD hinsichtlich der Pathogenese im ZNS liefert die Beobachtung, dass die Aktivierung von Mikroglia durch A $\beta$  und PrP<sup>Sc</sup> über den gleichen Signalübertragungsweg erfolgt (Combs et al., 1999), was auf eine mögliche Beteiligung ähnlicher oder gleicher Rezeptoren hindeutet. Einer der in Frage kommenden Rezeptoren ist formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1), der sowohl A $\beta$  als auch PrP<sup>106-126</sup> bindet (Le et al., 2001a; Le et al. 2001b). Weitere Rezeptoren, für die eine Interaktion mit A $\beta$  beschrieben wurde sind Scavenger-Rezeptoren, wie scavenger receptor class A (SR-A), scavenger receptor class B type I (SR-BI) (Husemann et al., 2002) und CD36 (El Khoury et al., 2003), RAGE (receptor for advanced glycation end products) (Yan, 1996) und CD14 (Fassbender et al., 2004). Aufgrund der oben genannten Parallelen zwischen AD und TSE könnten diese Rezeptoren auch an der Mikrogliaaktivierung durch PrP<sup>Sc</sup> beteiligt sein.

## **1.5 Das CD40-CD40Ligand-System**

### 1.5.1 CD40

CD40 ist ein 48-50 kDa Typ-I-Transmembranrezeptor aus der TNF-Rezeptor-Familie. CD40 besteht aus drei Monomeren, die nach Bindung des Liganden trimerisiert werden, wodurch der intrazelluläre Signalübertragungsweg ausgelöst wird. (Schönbeck et al., 2000). Eine CD40-Expression findet sich auf einer Reihe von Zellen, unter ihnen B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, Thymusepithelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und verschiedene Tumorzellen (Schönbeck et al., 2000).

### 1.5.2 CD40 Ligand

CD40Ligand (CD40L), ein 33 kDa Typ-II-Transmembranprotein, gehört zur TNF-Familie und bildet wie alle Mitglieder dieser Familie Trimere aus drei identischen Untereinheiten, durch die die Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren vermittelt wird. CD40L wird von T- und B-Lymphozyten, Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, Astrozyten, Monozyten/Makrophagen und Blutplättchen exprimiert (Schönbeck et al., 2000).

### 1.5.3 Signaltransduktion und Auswirkungen auf die Genexpression

CD40 besitzt keine eigene Kinase-Domäne, die Kopplung an intrazelluläre Signalübertragungswege erfolgt durch verschiedene TNF-R-assoziierte Faktoren (TRAF). Die Ligation von CD40 aktiviert verschiedene second messenger Systeme. Darunter finden

sich verschiedene Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK), die Phosphoinositide-3 (PI-3) Kinase, die Phospholipase C $\gamma$ 2 sowie die mitogen-aktivierten Proteinkinasen c-Jun N-terminal Kinase (JNK), p38 und Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK). Am Ende dieser verschiedenen Signalübertragungswege steht die Aktivierung des Nuklearfaktors (NF)- $\kappa$ B und weiterer Transkriptionsfaktoren wie NF-AT, AP1, STAT3 und STAT6 (van Kooten, 2000).

#### 1.5.4 Weitere Liganden für CD40

Neben CD40L existieren noch zwei zusätzliche Liganden für CD40: Das C4b bindende Protein (C4BP) und das 70 kDa heat shock protein (Hsp70) (Brodeur et al., 2003; Becker et al., 2002). C4BP ist eine regulierende Komponente im klassischen, durch opsonisierte Erreger ausgelösten Weg der Komplementkaskade und ist bislang auf Monozyten und Hepatozyten nachgewiesen worden. C4BP besitzt eine andere spezifische Bindungsstelle an CD40 auf B-Lymphozyten, löst aber in diesen die gleichen, im folgenden beschriebenen Effekte aus. Da sich C4BP physiologischerweise aber hauptsächlich im Blutstrom findet, wo es eine kleine Fraktion von B-Zellen vorhanden ist, spielt C4BP wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle für die Aktivierung von B-Lymphozyten. Möglicherweise wird C4BP aber in Entzündungsgebieten durch eingewanderte Monozyten gebildet, um B-Zell-Reaktionen zu verstärken (Brodeur et al., 2003).

Das 70 kDa Hitzeschockprotein (heat-shock protein 70 (Hsp70)) ist ein klassischer Monitor für zellulären Stress. Hsp70 hat antiapoptotische Effekte, indem es den durch die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien aktivierten apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) bindet, und dadurch die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 verhindert (Becker et al., 2002).

#### 1.5.5 Biologische Effekte/Pathophysiologie

Als erstes wurde die biologische Funktion des CD40-CD40L-Systems in der T-Zell-vermittelten humoralen Immunität entdeckt. Wenn eine B-Zelle ein thymusabhängiges Antigen, also ein Antigen, das einen B-Lymphozyten nur in Verbindung mit einem externen Kostimulierungssignal aktivieren kann, aufgenommen hat, baut sie es in Haupthistokompatibilitäts-Komplex-Klasse-II ein und präsentiert es auf ihrer Zelloberfläche. Wird dieses Antigen durch eine CD4<sup>+</sup> T-Helferzelle erkannt, so exprimiert sie CD40L auf ihrer Oberfläche. Bei der Bindung der T-Helferzelle an die betreffende B-Zelle wird über die CD40L-CD40-Interaktion dann das notwendige Kostimulierungssignal zur Aktivierung der B-Zelle vermittelt, was ihre klonale Selektion und Proliferation, einen Immunglobu-

lin-Isotypenwechsel sowie ihre Differenzierung zur Plasmazelle oder zur Gedächtniszelle zur Folge hat. Weiterhin bewirken CD40-CD40L-Interaktionen die Bildung von Keimzentren, in denen B-Zellen als Gedächtniszellen überleben. Die Expression von CD40L auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist transient und eng reguliert. Nach Stimulation zeigt sich eine CD40L-Expression auf der Zelloberfläche bereits nach 5-15 min, wobei es sich um bereits synthetisiertes CD40L handelt. Nach 1-2 h setzt eine zweite Welle der CD40L-Expression ein, die sich diesmal aus de novo synthetisiertem Protein rekrutiert und deren Maximum nach 6-8 h erreicht ist. Danach nimmt die Proteinsynthese graduell ab. Die CD4<sup>+</sup> T-Zelle inaktiviert oberflächlich gebundenen CD40L nach Ligation der B-Zelle entweder durch Internalisierung und lysosomalen Abbau oder durch Abspaltung einer inaktiven, löslichen Form, die als löslicher CD40L (sCD40L) bezeichnet wird. (Graf et al., 1995; van Kooten, 2000).

Im ZNS wird CD40 konstitutiv auf Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und Endothelzellen exprimiert, während CD40L auf aktivierten Astrozyten, Endothelzellen und in der weichen Gefäßmuskulatur gefunden wurde (Tan et al.; 1999; Abdel-Haq, 1999; Tan et al., 2002a). Die Expression von CD40 auf Neuronen hat eine neuroprotektive Funktion. So werden Neuronen in vitro durch die Ligation mit CD40L gegen Stress geschützt, der durch Serumentzug oder den Entzug von nerve growth factor- $\beta$  (NGF- $\beta$ ) verursacht wird. Dieser Schutz beruht zum einen auf einer Hemmung der JNK in den Neuronen, die durch die oben genannten Stressfaktoren induziert wird (Tan et al., 2002a). Die JNK, auch als stress-aktivierte Protein-Kinase (SAPK) bezeichnet, bewirkt die Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien und dadurch die Aktivierung der zur Apoptose führenden Effektor-Caspasen. Zum anderen stimuliert CD40L den p44/42 mitogen activated protein kinase (MAPK)-Signalübertragungsweg, durch den der neuroprotektive Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert wird (Tan et al., 2002a; Mattson, 2000). Neben der Reaktion auf die oben genannten Stressoren entwickelten Mäuse, denen das CD40-Gen fehlt, ab dem Alter von 16 Monaten eine fortschreitende Neurodegeneration, was darauf hindeutet, dass das CD40-CD40L-System auch einen Schutzmechanismus vor altersbedingtem Stress darstellt. Einen Hinweis darauf könnte auch die Beobachtung liefern, dass sich in den Gehirnen alternder Mäuse erhöhte Expressionslevel von CD40 finden (Lee, 2000). Auch Mikroglia exprimieren konstitutiv geringe Level an CD40. In Mikroglia führt die Ligation von CD40 über den p44/42 MAPK-Signalübertragungsweg zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B, was eine vermehrte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  zur Folge hat. (Tan et al., 1999).

Im Laufe der Zeit wurde die Bedeutung des CD40-CD40L-Systems als Modulator verschiedener Entzündungsreaktionen entdeckt. Das beinhaltet beispielsweise die Induktion von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 oder E-Selektin auf Endothelzellen oder von proinflammatorischen Zytokinen wie Il-1, Il-6 oder  $TNF\alpha$  auf Monozyten, Mikroglia, Fibroblasten, Keratinozyten, dendritischen Zellen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen (Schönbeck et al., 2000).

CD40-CD40L spielt bei einer Reihe chronisch-entzündlicher Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen als Mediator eine wichtige pathophysiologische Rolle (Cron, 2003). Zu diesen gehören Atherosklerose, insulinabhängiger Diabetes, Morbus Crohn, Multiple Sklerose (MS), rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematosus und Graft-versus-host-Erkrankung (Schönbeck et al., 2000).

Gemeinsam ist diesen Krankheiten, dass die Autoregulation des CD40-CD40L-Systems gestört ist, weil die CD40L-Signalübertragung durch Infiltration von T-Zellen und Monozyten verstärkt ist und/oder durch fehlende Deaktivierung von CD40L anhält (Cron, 2003). Bei der Multiplen Sklerose wurden beispielsweise in geschädigtem Gewebe CD40-exprimierende Mikroglia und Makrophagen kolokalisiert mit eingewanderten, CD40L exprimierenden  $CD4^+$ T-Zellen gefunden. Offensichtlich liefert CD40L in der MS ein Kostimulierungssignal zur Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen, weshalb die Blockierung dieses Systems als therapeutischer Ansatz vorgeschlagen wurde (Gerritse et al., 1996). Im Falle der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell für die MS, konnte zudem gezeigt werden, dass die Gabe eines anti-CD40L Antikörpers die Krankheitsentwicklung aufhält (Gerritse et al., 1996), und dass in CD40L defizienten Mäusen die EAE nicht ausgelöst werden kann (Grewal et al., 1996). Auch mit der Pathogenese der AD wurden CD40-CD40L-Interaktionen mehrfach in Verbindung gebracht, und es wurde vorgeschlagen, diesen Signalübertragungsweg als therapeutischen Ansatzpunkt zu wählen (Tan et al., 2002b; Calingasan et al., 2002). In vitro-Studien haben gezeigt, dass CD40L in Synergie mit A $\beta$  die Aktivierung von Mikroglia stimuliert (Tan et al., 1999); in einer weiteren Studie zeigten Tan *et al.*, dass CD40/CD40L auch in vivo einen Einfluss auf die AD-Pathogenese hat. So wiesen transgene Mäuse, die A $\beta$  überproduzieren (sog. Alzheimer-Mäuse) aber defizient für CD40L sind, im Vergleich zu Alzheimer-Mäusen, die das Gen für CD40L besitzen, eine verminderte Gliose und Ablagerung von A $\beta$  auf (Tan et al., 2002b).